

Aus dem Anatomischen Institut der
Justus-Liebig-Universität in Gießen
Direktor: Prof. Dr. E. Tonutti

Über den Einfluß langfristiger Cortisonvorbehandlung auf die hämorrhagische Nekrose der Nebennierenrinde nach Diphtherietoxinvergiftung

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktor-Grades bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus-Liebig-Universität zu Gießen

eingereicht von
Karl Dietmar Hoede
Tierarzt aus Würzburg

Gießen 1957

Aus dem Anatomischen Institut der
Justus-Liebig-Universität in Gießen
Direktor: Prof. Dr. E. Tonutti

Über den Einfluß
langfristiger Cortisonvorbehandlung
auf die hämorrhagische Nekrose
der Nebennierenrinde
nach Diphtherietoxinvergiftung*)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktor-Grades bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus-Liebig-Universität zu Gießen

eingereicht von
Karldietmar Hoede
Tierarzt aus Würzburg

Gießen 1957

*) Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft
Ausgeführt unter Leitung von E. Tonutti

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät in Gießen

Dekan: Prof. Dr. R. Wetzel

Berichterstatter: Prof. Dr. E. Tonutti

Tag der mündlichen Prüfung 22. Juni 1957

Sonderdruck aus

„Endokrinologie“ 33. Band, Heft 5/6, 1956

Johann-Ambrosius-Barth-Verlag Leipzig

Bekanntlich führt die Diphtherietoxinvergiftung beim Meerschweinchen zu einer schweren hämorrhagischen Nekrose der Nebennierenrinde. Der Eintritt dieser zerstörenden Wirkung des Diphtherietoxins (Di-Toxin) ist strikte an die gleichzeitig ablaufende ACTH-Stimulierung des Rindenorganes gebunden. Bei hypophysenlosen Tieren bleibt daher die Nebennierenrinde, trotz Di-Toxinvergiftung, morphologisch intakt (15, 18).

Nach der Theorie von Sayers (11) wird die kortikotrope Partialfunktion der Adenohypophyse durch den Rindenhormonspiegel kontrolliert. Jede Stressorwirkung, darunter auch die Di-Toxinvergiftung, führt zu einem vermehrten Bedarf an Rindenhormonen. Nach der Sayers-Theorie würde das damit verbundene Abnehmen des Rindenhormonspiegels zur Auslösung der ACTH-Sekretion führen.

Wie Tonutti (17, 18) fand, ist eine kurzfristige Vorbehandlung von Meerschweinchen mit Cortison nicht in der Lage, die ACTH-Stimulierung der Nebennierenrinde nach Di-Toxin zu unterdrücken.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit geprüft, durch langfristige Cortisonverabreichung, die nach Di-Toxin eintretende ACTH-Stimulierung des Nebennierenrindengewebes zu blockieren. Die Di-Toxinvergiftung wurde als Modell gewählt, da der Mechanismus der Wirkung dieses Toxins auf die Nebennierenrinde genau bekannt ist (18, 19), und weil das Eintreten oder Fehlen der hämorrhagischen Nekrose nach tödlichen Toxindosen einen exakten Schluß über vorhandene oder fehlende ACTH-Stimulierung der Nebennierenrinde zuläßt.

Material und Methodik

Die Untersuchungen wurden an 32 Meerschweinchen (30 ♂, 2 ♀) mit einem Gewicht um 280 ± 40 g, die aus einheitlicher Zucht stammten, vorgenommen. Die Tiere wurden in einem temperaturkonstanten Raum bei $23 \pm 1^\circ \text{C}$ einige Tage vor und während des Versuches gehalten, und wurden mit Hafer, Heu und Grünfutter ernährt.

Alle Tiere erhielten 5 dlm Di-Toxin in 0,5 ccm Aqua dest. subkutan in die linke Leistenbeuge injiziert. Folgende Versuchsgruppen wurden gebildet:

Gruppe 1: 12 Normaltiere, die 5 dlm Di-Toxin erhielten.

Gruppe 2: 10 Normaltiere, die nach 4wöchentlicher Vorbehandlung mit täglich 5 mg Cortison 5 dlm Di-Toxin erhielten.

Gruppe 3: 10 Normaltiere, die nach 10 tägiger Vorbehandlung mit täglich 5 mg Cortison 5 dlm Di-Toxin bekamen.

Alle Tiere wurden mit Chloroform kurz vor dem Spontanod abgetötet, soweit dieser vor der 33. Stunde zu erwarten war. Bei Tieren, die zu dieser Zeit noch nicht in der Agonie waren, wurde der Spontanod nicht abgewartet, da es darauf ankam, eine möglichst einheitliche Zeitdauer der Toxinwirkung den histologischen Befunderhebungen bei den verschiedenen Versuchsgruppen zugrunde zu legen.

Histologische Technik: Unmittelbar nach dem Tode wurden die linken Nebennieren in Bouinscher Lösung 8—10 Stunden fixiert. Paraffineinbettung, Schnitte von 5μ Dicke, Färbung mit Hämatoxylin-Orange G-Phosphormolybdänsäure-Anilinblau. Die rechte Nebenniere wurde in Formol 1:9 fixiert. Gefrierschnitte, Darstellung der Fette mit Scharlachrot und Untersuchung der doppelbrechenden Lipoide an ungefärbten Gefrierschnitten.

Auswertung: Außer der Beurteilung des Auftretens von Hämorrhagien, des Verhaltens der mit Scharlachrot färbbaren Fette sowie der doppelbrechenden Lipoide der Nebennierenrinde wurden mit Hilfe des Schraubenokularmikrometers bei Immersionsvergrößerung die Durchmesser von je 200 Zellkernen pro Tier aus der äußeren Zona fasciculata gemessen. Bei den mit Di-Toxin behandelten Normaltieren war es infolge der schweren hämorrhagischen Nekrosen erforderlich, zur Kernmessung Bezirke auszuwählen, in welchen noch mehr oder weniger große Zellverbände in normalem Zustand erhalten waren. Aus den Durchmessern wurde das Zellkernvolumen berechnet und aus den gefundenen Werten pro Tier das sog. „Gesamtvolumen“ für 100 Zellkerne ermittelt und graphisch dargestellt. Da bei der Bestimmung der Kerndurchmesser von Innenrand zu Innenrand der Kernmembran gemessen wurde, sind die Kernvolumina etwas geringer ausgefallen, als in früheren Untersuchungen anderer Autoren (1).

Außer den in den Versuchsgruppen angeführten Tieren standen noch 5 hypophysektomierte Meerschweinchen zur Verfügung, die 4 Wochen nach der Operation abgetötet wurden. Diese Tiere dienten zu Vergleichszwecken, um die nach Hypophysektomie erfolgte Abnahme der Kernvolumina, der nach Cortisonbehandlung eintretenden, gegenüberstellen zu können.

Ergebnisse

Bei sämtlichen Normaltieren waren nach Di-Toxinvergiftung die Nebennieren makroskopisch vergrößert und dunkelrot gefärbt. Die Überlebensdauer betrug 28—34 Stunden. Histologisch boten die Nebennierenrinden das Bild der bekannten hämorrhagischen Nekrose dar, wie sie von vielen Autoren bereits beschrieben wurde (2—6, 8—10, 13, 18, 19). Die hämorrhagische Nekrose erstreckte sich auf weite Rindenbereiche. Meist fanden sich nur in der äußeren Faszikulata und der Glomerulosa noch einzelne Felder von großen, hellen Rindenzellen (Abb. 1). Die scharlachrotfärbbaren Fette waren durchwegs deutlich vermindert, sehr feintropfig, dagegen auf die normalerweise fettarmen oder fettfreien Innenbereiche und kapselnahen Bezirke der Nebennierenrinde ausgebreitet. Es bot sich also das Bild der bekannten (10), als Folge der ACTH-Stimulierung eintreten-

den Änderung der Lipoidverteilung, mit Ausbreitung auf die gesamte Rinde, bei gleichzeitiger spärlicher Beladung einzelner Rindenzellen (Abb. 2). Die doppelbrechenden Lipoide waren bis auf minimale Reste verschwunden (Abb. 3).

Ein gänzlich anderes Verhalten zeigten die Nebennieren jener Tiere, die die gleiche Toxindosis erhalten hatten, jedoch 4 Wochen vorher mit Cortison vorbehandelt waren. Die Überlebensdauer betrug, wie bei den

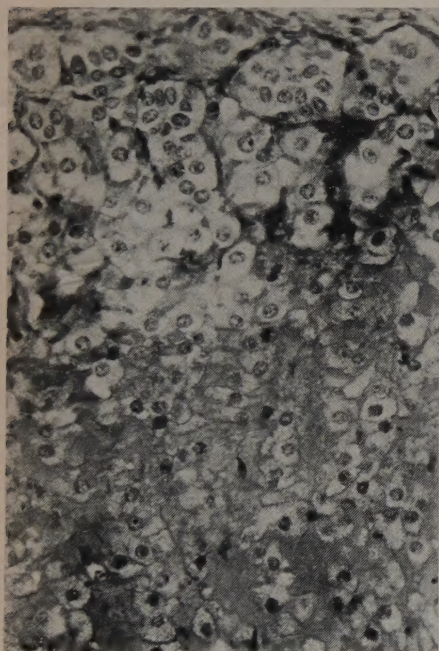


Abb. 1. Hämorrhagische Nekrose der Nebennierenrinde 33 Stunden nach 5 dlm Di-Toxin.
Vergr. 315mal

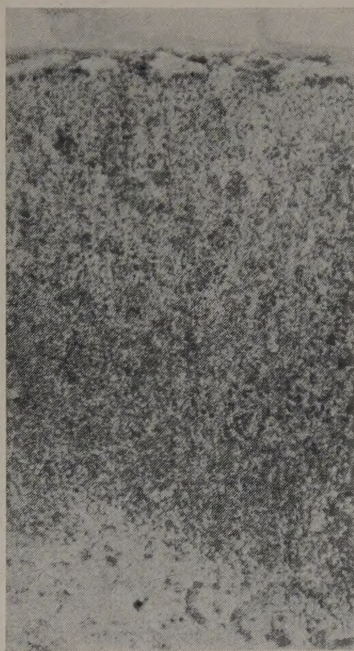


Abb. 2. Wie Abb. 1. Gefrierschnitt, Scharlachrotfärbung, feintropfige Ausbreitung der Fette über die ganze Rinde.
Vergr. 80mal

nicht vorbehandelten Normaltieren 28—33 Stunden, abgesehen von einem Tier, das nach 24 Stunden starb. Schon makroskopisch fielen die Nebennieren durch ihre Kleinheit und Abplattung sowie besonders durch ihre gelbe Färbung auf. Die für die Di-Toxinvergiftung charakteristische Rotfärbung fehlte bei allen Tieren.

Mikroskopisch war das Rindenparenchym praktisch vollkommen intakt, abgesehen von wenigen, ganz kleinen Hyperämieherden. Die Nebennierenrindenzellen waren unbeschädigt; Nekroseherde fehlten vollständig (Abb. 4). Die Rindenzellen erschienen etwas verkleinert, insbesondere

waren die Kerne kleiner als gewöhnlich, und zeigten vielfach etwas geknitterte Ränder.

Die scharlachrotfärbbaren Fette bildeten einen dichten, aber schmalen und sehr scharf begrenzten Streifen, der die äußere Faszikulata einnahm (Abb. 5). Die Rinde war im Ganzen verschmälert. Die Glomerulosa und Retikularis dagegen relativ verbreitert und praktisch ganz fettfrei.

Im Vergleich zu den nicht mit Cortison vorbehandelten Versuchstieren hat keine Ausbreitung der Fettsubstanzen über das ganze Rindenorgan

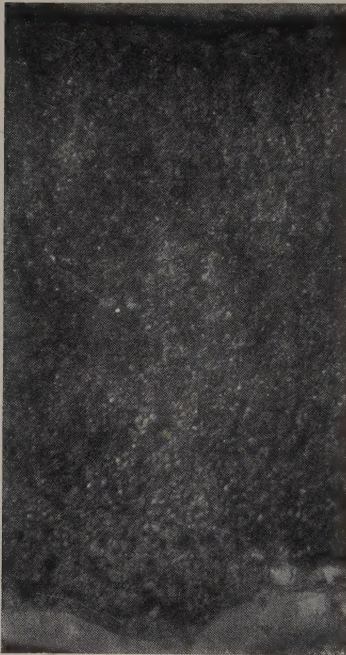


Abb. 3. Wie Abb. 1. Ungefärbter Gefrierschnitt im polarisierten Licht. Schwund der doppelbrechenden Lipide bis auf minimale Reste.

Vergr. 80mal

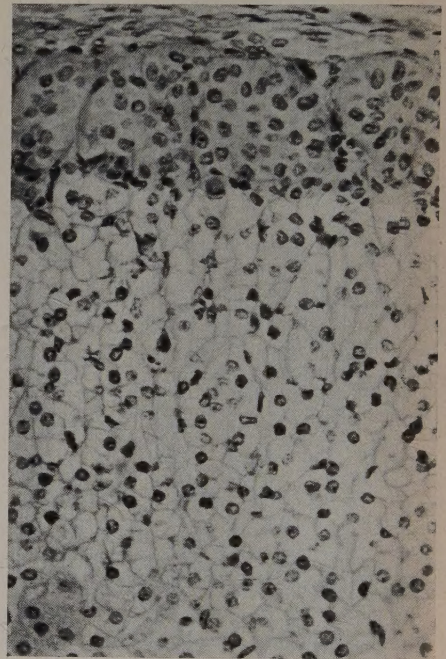


Abb. 4. Nebennierenrinde nach 4 wöchentlicher Vorbehandlung mit täglich 5 mg Cortison, 33 Stunden nach 5 dlm Di-Toxin; keine hämorrhagische Nekrose. Vergr. 315mal

stattgefunden. Ferner ist keine Abnahme der Fettbeladung der Einzelzellen eingetreten. Vielmehr sind innerhalb des fetthaltigen Rindenabschnitts die Einzelzellen dicht mit Lipoiden vollgepfropft. Das gleiche gilt für das Verhalten der doppelbrechenden Lipide, wie die Abb. 6 erkennen läßt. Diese bilden im polarisierten Licht ein dichtes leuchtendes Band, dessen Lagerung und Breite sich mit dem der scharlachrotfärbbaren Fettsubstanzen weitgehend deckt. Eine Abnahme der doppelbrechenden

Lipoide, wie bei der Versuchsgruppe 1, ist somit im mikroskopischen Bild nicht feststellbar.

Die Befunde bei der Versuchsgruppe 3, d. h. bei den Tieren, die nur 10 Tage vor der Di-Toxingabe mit Cortison vorbehandelt wurden, ordnen sich zwischen Versuchsgruppe 1 und 2 ein. Die Überlebensdauer betrug wiederum 29—34 Stunden. Von den 10 Tieren wiesen 3 makroskopisch gelbe Nebennieren auf, während 6 andere zwar noch die gelbe Grundfarbe der Nebenniere erkennen ließen, daneben aber mehr oder weniger große, rötliche Flecken zeigten. Bei einem Tier war die Nebenniere im ganzen rotbraun gefärbt.

Histologisch ergab diese Versuchsgruppe ein recht unterschiedliches Bild des Rindenorgans. Bei 5 Tieren fanden sich nur geringe, mikro-

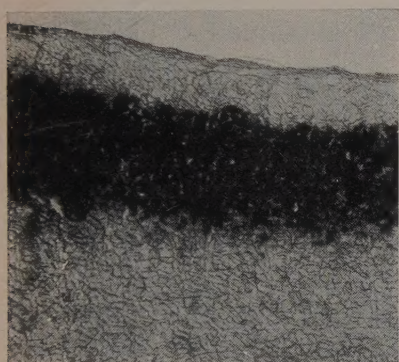


Abb. 5. Wie Abb. 4. Gefrierschnitt, Scharlachrotfärbung, Einengung der Fette auf einen schmalen, scharf begrenzten Streifen. Breite Außenzone und breite Innenzone frei von Fetten.
Vergr. 80mal

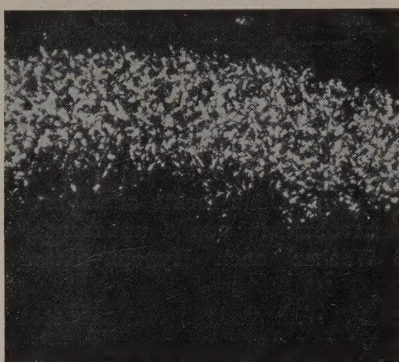


Abb. 6. Wie Abb. 4. Ungefärbter Gefrierschnitt im polarisierten Licht. Doppelbrechende Lipoide erhalten, in gleicher Verteilung wie die scharlach rotfärbbaren Fette.
Vergr. 80mal

skopisch erkennbare Blutungsherde, während Nekrosen praktisch gänzlich fehlten. Die Befunde bei diesen Tieren gleichen somit weitgehend dem Verhalten jener Tiere, die vor der Toxingabe 4 Wochen mit Cortison vorbehandelt waren. Ein weiteres Tier wies ziemlich schwere Läsionen im Bereich der Faszikulata auf, während die restlichen 4 Tiere mäßig ausgedehnte Hämorrhagien und Nekrosen darboten. In keinem dieser Fälle waren jedoch Zerstörungen des Rindengewebes in dem Maße eingetreten, wie sie bei den Normaltieren nach Di-Toxin beobachtet wurden.

Bei der Scharlachrotfärbung fand sich die Faszikulata reichlich mit Fetten beladen, deren Verteilung etwa der Norm entsprach. Eine Ausbreitung der Fette auf die Glomerulosa und Retikularis war nicht eingetreten. Die doppelbrechenden Lipoide zeigten eine ähnliche Verteilung

Die unspezifische Auswirkung des Di-Toxins besteht in der Abnahme der Fettsubstanzen, der Änderung ihrer Verteilung, der Abnahme der doppelbrechenden Lipide und der Vergrößerung der Nebennierenrindenzellen, sowie dem Umbau der Rindenzone im Sinne der progressiven Transformation (14, 16, 18). Alle diese Veränderungen sind das Ergebnis der ACTH-Stimulierung, die im vorliegenden Fall durch die Stressorwirkung des Di-Toxins ausgelöst wird.

Die hämorrhagischen Nekrosen des Rindengewebes nach Di-Toxin sind bekanntlich an die gleichzeitig ablaufende ACTH-Stimulierung des Rindenorgans geknüpft (15, 18). Wird diese unterdrückt, so bleibt die hämorrhagische Nekrose, die Ausdruck einer gewebserstörenden Komponente des Di-Toxins ist, aus.

Die Versuchsergebnisse zeigen somit, daß eine 28 tägige Vorbehandlung mit Cortison das Rindenorgan soweit stilllegt, daß innerhalb der Versuchszeit keine genügende ACTH-Wirkung, welche die Voraussetzung für das Wirksamwerden der gewebserstörenden Komponente des Di-Toxins ist, am Rindengewebe eintritt.

Die zweite Versuchsreihe mit nur 10 tägiger Vorbehandlung führt gleichfalls zu einer sehr eindrucksvollen Hemmung der Di-Toxinwirkung an der Nebennierenrinde. Die bei dieser Versuchsgruppe aufgetretenen kleinen Läsionen zeigen jedoch bereits an, daß die ACTH-Stimulierung des Rindenorgans nach dieser kürzeren Vorbehandlung nicht mehr vollständig unterdrückt werden kann.

Die früheren Versuche Tonuttis (17) mit eintägiger Cortisonvorbehandlung vermochten die Di-Toxinwirkung an der Nebennierenrinde nicht zu verhindern, d. h. es gelang nicht in diesem kurzfristigen Versuch die ACTH-Stimulierung des Rindenorgans in erkennbarem Maße zu hemmen.

Für die Sayerssche Theorie der homöostatischen Regulation der ACTH-Ausschüttung aus der Adenohypophyse durch die Rindenhormone ergibt sich somit aus allen Versuchsergebnissen folgendes: Eine kurzfristige Vorbehandlung mit Cortison, die zu einer den Bedarf an Rindenhormon deckenden Erhöhung des Rindenhormonspiegels führt, reicht nicht aus, um bei schweren Reizen, wie sie die Di-Toxinvergiftung darstellt, den Mechanismus der ACTH-Ausschüttung zu blockieren. Eine längerwährende Überhöhung des Rindenhormonspiegels durch mehrwöchentliche Vorbehandlung mit Cortison vermag dagegen die Aktivierung der Nebennierenrinde soweit zu unterdrücken, daß das Di-Toxin keinen nennenswerten Schaden am Rindenorgan mehr hervorruft. Praktisch gleicht das Versuchsergebnis in dieser Hinsicht demjenigen nach Hypophysektomie, d. h. es kommt zum völligen Ausfall der Toxinwirkung an der Nebennierenrinde.

Es scheint daher, daß der homöostatische Regulationsmechanismus im Sinne der Sayers-Theorie, wie schon früher vermutet wurde (12, 18), längere Umstellungen in der ACTH-Abgabe reguliert, nicht aber akute.

Die Versuchsergebnisse können zur Zeit auf zweierlei Art interpretiert werden:

1. Besteht die Möglichkeit, daß die längerwährende Cortisonvorbehandlung in der Tat die Bildung oder Abgabe von ACTH aus der Adenohypophyse blockiert, wodurch die Nebennierenrinde ihre Reaktionsfähigkeit gegen Di-Toxin verliert.

2. Die mehrwöchentliche Cortisonvorbehandlung führt, wie am Kernvolumen ersichtlich ist, zu ähnlichen Rückbildungsgraden der Nebennierenrinde, wie nach Hypophysektomie. Es kann daher sein, daß auch bei normaler ACTH-Stimulierung das Nebennierenrindengewebe aus diesem Rückbildungszustand sich während der ca. 30stündigen Versuchsdauer nicht mehr genügend entfaltet, um gegenüber Di-Toxin empfindlich zu werden.

Eine Entscheidung zwischen diesen beiden Interpretationen ist nur möglich durch Bestimmung des ACTH-Gehalts des Blutes nach Di-Toxinvergiftung bei cortisonvorbehandelten Tieren.

Zusammenfassung. An normalen Meerschweinchen wurde nach langfristiger Cortisonvorbehandlung die Wirkung des Di-Toxins an der Nebennierenrinde geprüft. Es ergab sich:

1. Nach 28tägiger Vorbehandlung mit täglich 5 mg Cortison zeigt die Nebennierenrinde ein ähnliches Bild wie nach Hypophysektomie und wird unempfindlich gegenüber Di-Toxin.

2. Nach 10tägiger Vorbehandlung treten ebenfalls deutliche Rückbildungserscheinungen der Nebennierenrinde auf, wie sie nach kurzfristiger Hypophysektomie beobachtet wurden. Di-Toxin bewirkte in diesen Fällen mäßige, gegenüber Normaltieren deutlich geringere Zerstörungen.

Schrifttum. 1. Boguth, W., H. Langendorff und E. Tonutti: *Med. Welt* 1951, **20**, 408. — 2. Dietrich, A. und H. Siegmund: *Nebennieren. Hdb. d. pathol. Anat. u. Histol.* **9**. Springer, Berlin 1926. — 3. Frick, E.: *Dtsch. Zschr. Nervenhlk.* 1949, **160**, 237. — 4. Günther, W. G.: *Beitr. path. Anat.*, 1941, **105**, 256. — 5. Heinlein, H.: *Klin. Wschr.* **1949**, 721. — 6. Hoerr, N.: *Amer. J. Anat.* 1931, **48**, 139. — 7. Ingle, R. D., G. M. Higgins and E. C. Kendall: *Anat. Rec.*, 1938, **71**, 363. — 8. Liebegott, G.: *Beitr. path. Anat.*, 1944, **109**, 93. — 9. Metzker, H.: *Frankf. Zschr. Path.* 1943, **58**, 156. — 10. Sadownikow, W.: *Virchows Arch. path. Anat.* 1949, **317**, 315. — 11. Sayers, G., and M. A. Sayers: *Recent Progr. Hormone Res.*, N. Y. 1948, **2**, 81. — 12. Selye, H.: *Annual Report on Stress* 1951. Acta Inc. Montreal 1951. — 13. Tonutti, E.: *Klin. Wschr.* **1941**, 1196. — 14. Derselbe: *Zschr. mikrosk.-anat. Forsch.*, 1942, **52**, 32. — 15. Derselbe: *Klin. Wschr.* **1949**, 569. — 16. Derselbe: *Endokrinologie* 1951, **28**, 1. — 17. Derselbe: *Arzneimittel-Forsch.*, 1952, **2**, 97. — 18. Derselbe: *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 1953, **36**, 123. — 19. Derselbe: *Med. Klin.* 1954, **49**, 281.

Lebenslauf

Am 11. September 1929 wurde ich als Sohn des damaligen Privatdozenten Dr. Karl Hoede und seiner Ehefrau Kläre, geborene Dittmar, in Würzburg geboren. Nach vierjähriger Volksschulbildung besuchte ich von 1940 bis 1945 das Neue Gymnasium in Würzburg. Nach dem Kriegsende setzte ich meine Ausbildung am Realgymnasium in Würzburg, von dessen Wiedereröffnung 1946 bis zum Ablegen der Reifeprüfung im Sommer 1949, fort.

Bis zu meiner Zulassung zum tiermedizinischen Studium belegte ich vom SS. 1950 bis einschließlich WS. 1951/52 an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg Rechts- und Staatswissenschaften und ab SS. 1952 an der Justus-Liebig-Universität in Gießen Veterinärmedizin. Hier legte ich die tierärztliche Vorprüfung im März 1954 und die tierärztliche Prüfung am 30. März 1957 ab.

An der vorliegenden Dissertation arbeitete ich von Januar 1955 bis Dezember 1955 im Anatomischen Institut in Gießen.

Vom 22. April 1957 bis 22. Oktober 1957 leistete ich meine Veterinärpraktikantenzeit bei Herrn Dr. von den Driesch in Siegburg ab und erhielt am 22. Oktober 1957 die Approbation als Tierarzt.

An dieser Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. E. Tonutti für die Überlassung des Themas und für die Anleitungen zum wissenschaftlichen und experimentellen Arbeiten.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	279
Material und Methodik	279
Histologische Technik	280
Auswertung	280
Ergebnisse	280
Besprechung	284
Zusammenfassung	286
Literaturverzeichnis	286

